



Dr hab. Tamara Aleksandrak-Piekarczyk
Pracownia Mikrobiologii Stosowanej
Instytut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk
ul. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa
email: tamara@ibb.waw.pl
tel: (+48) 22 592 12 13

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr JUSTYNY ŚMIAŁEK-BARTYZEL

„Badania nad biosyntezą oraz aktywnością prozapalną form bakteriocyny peptydowej
BacSp222”

Zjawisko powstawania oporności bakterii na substancje o działaniu przeciwmikrobiologicznym takie jak antybiotyki stanowi poważny i ciągle narastający problem w medycynie, weterynarii i rolnictwie. Aby przezwyciężyć ten problem, pilnie potrzebny jest rozwój związków o działaniu przeciwbakteryjnym nowej generacji o nowych mechanizmach działania. Tematem badań Pani mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel są bakteriocyny, czyli rybosomalnie syntetyzowane bakteryjne peptydy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, niezwykle cenne pod kątem ich potencjalnych zastosowań w medycynie, biotechnologii i przemyśle spożywczym. Bakteriocyny wykazują potencjał jako alternatywa dla antybiotyków, szczególnie w leczeniu zakażeń wywołanych przez antybiotykooporne szczepy bakterii. Co więcej, mają zastosowanie jako naturalne konserwanty żywności, szczepy produkujące bakteriocyny mogą zostać wprowadzone do stosowania jako probiotyki, a wyniki najnowszych badań wskazują nawet na możliwość ich zastosowania w terapii nowotworów. Mimo tak wielu potencjalnych możliwości aplikacyjnych, bakteriocyny nie są powszechnie stosowane, co może wynikać m.in. z braku wiedzy na temat molekularnych mechanizmów ich działania i rozwoju oporności.

W nurt powyższych aspektów badawczych doskonale wpisuje rozprawa doktorska mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel, której tematyka, ze względu na ograniczoną obecną wiedzę dotyczącą działania bakteriocyn, jest aktualna i atrakcyjna naukowo. Przedstawiona do recenzji praca została wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Pana dr. hab. Pawła Maka, prof. UJ. Rozprawa została zredagowana w formie tzw. „zszywki”, która składa się z 13 rozdziałów, z których najistotniejsze to: (i) streszczenie w języku polskim i angielskim, (ii) wykaz użytych skrótów, (iii) wstęp teoretyczny, (iv) opis celu badań, (v) trzy oryginalne publikacje wraz z materiałami dodatkowymi, (vi) opis nieopublikowanych wyników, (vii) dyskusja, (viii) posumowanie wniosków z badań, (ix) oświadczenia współautorów publikacji oraz (x) liczący 212 pozycji spis literatury. Cele pracy zostały przejrzysto sformułowane. Artykuły naukowe wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w pismach: *International Journal of Molecular Sciences* - 1 publikacja (8 autorów), *Journal of Inflammation Research* – 1 publikacja (6 autorów), *Inflammation Research* (5 autorów). Należy podkreślić fakt, iż mgr Justyna Śmiałek-Bartyzel jest pierwszą autorką w trzech pracach, z zaznaczeniem równorzędnego udziału z innym współautorem w jednej z nich, co świadczy o istotnej roli jaką odegrała w ich powstaniu. Znajduje to też potwierdzenie w oświadczeniach dotyczących wkładu pracy w przygotowaniu publikacji, z których wynika, iż przewyższał on 50% lub 30% w przypadku artykułu z dzielonym wkładem. Doktorantka dokładnie określiła swój wkład w przygotowanie każdej z publikacji, co zostało potwierdzone w zebranych oświadczeniach współautorów. Podstawę rozprawy stanowi zatem samodzielna i wyodrębniona część prac zbiorowych, co jest zgodne z wymaganiami odpowiedniej ustawy. W wyżej wymienionych pracach, mgr Śmiałek-Bartyzel uczestniczyła w opracowaniu metodyki, wykonaniu większości eksperymentów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz pisaniu manuskryptu, co świadczy o znaczącym wkładzie Doktorantki w ich powstanie. Jednak w przypadku dwóch publikacji zastanawiający jest brak uczestnictwa mgr Śmiałek-Bartyzel w opracowaniu koncepcji pracy, lub chociaż w planowaniu prac badawczych, co jest istotnym parametrem przy ocenie wkładu w wykonanie pracy doktorskiej. Nie znalazłam również informacji na temat budowania koncepcji pracy w przypadku żadnego z współautorów tych dwóch publikacji, co może świadczyć, że ta informacja została przeoczona podczas przygotowywania oświadczeń, jednak nie wyjaśnia, czy Doktorantka faktycznie miała udział w tym istotnym procesie.

Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy są pracami eksperymentalnymi, które łączy tematyka szerokich analiz bakteriocynty BacSp222, przeciwbakteryjnego peptydu naturalnie produkowanego przez odzwierzęcy oportunistyczny patogen, *Staphylococcus pseudintermedius* 222. Tematyka badawcza wszystkich publikacji stanowi spójną całość, a każdy kolejny artykuł stanowi logiczną kontynuację badań prowadzonych we wcześniejszych pracach. Uważam, że najważniejsze osiągnięcia badawcze przedstawione w publikacjach to:

- w artykule Śmiałek i wsp. (*International Journal of Molecular Sciences*; 2021) – wykazanie, że szczep produkcyjny wydziela BacSp222 w aż trzech formach: niezmodyfikowanej i dwóch zmodyfikowanych potranslacyjnie poprzez przyłączenie grup sukcyńlowych do epsilon-aminowych reszt lizyny (K20 lub K11 i K20). Jest to o tyle istotne odkrycie, ponieważ nie opisano dotąd takiej nietypowej formy

modyfikacji u żadnej z bakteriocyn. Co ciekawe, modyfikacja ta nie prowadziła do zmian w strukturze bakteriocyny, pomimo znacznego zmniejszenia jej aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej, a efekt ten może być spowodowany zmianą ładunku peptydu z dodatniego na ujemny. Równie ciekawym odkryciem jest wykazanie, iż bursztynylacja jest procesem nieenzymatycznym, najprawdopodobniej zależnym od bursztynylo-CoA i indukowanym warunkami stresowymi, co sugeruje, iż obserwowane modyfikacje potranslacyjne są formą ochrony komórek producenta przed wydzielaną bakteriocyną.

- w artykule Śmiałek i wsp. (Journal of Inflammation Research; 2022) – wskazanie aktywności BacSp222 dodatkowej do bakteriobójczej i cytotoksycznej, którą jest działanie prozapalne wobec komórek monocytarno-makrofagowych i neutrofilów, które w obecności bakteriocyny produkowały odpowiednio czynnik martwicy nowotworów (TNF) i IL-8. Co ciekawe, sukcylnylacja nie zmniejszała aktywności immunomodulacyjnej bakteriocyny w przeciwieństwie do niższego potencjału przeciwbakteryjnego lub cytotoksyczności takiej zmodyfikowanej formy ustalonej w poprzednich badaniach.

- w artykule Śmiałek-Bartyzel i wsp. (Inflammation Research; 2023) – określenie potencjalnego mechanizmu odpowiedzi prozapalnej aktywowanej przez BacSp222 w komórkach eukariotycznych. Istotnym osiągnięciem jest fakt, że w tym szlaku BacSp222 jest nowym ligandem dla kompleksu Toll-podobnych receptorów komórkowych TLR2 i TLR6, a po jego związaniu i internalizacji, indukuje sygnalizację prozapalną, która wykorzystuje szlaki zależne od mieloidalnego czynnika różnicowania 88 MyD88 i jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B. Co istotne, i co odróżnia tę pracę od innych badań dedykowanych określeniu potencjału immunomodulacyjnego bakteriocyn oraz świadczy o wysokiej jakości otrzymanych wyników, wszystkie formy BacSp222 zostały dokładnie oczyszczone i zweryfikowane pod kątem zanieczyszczenia innymi bakteryjnymi immunogenami.

Wyniki uzyskane w rozprawie zostały otrzymane przez Panią Śmiałek-Bartyzel przy użyciu bogatego wachlarza metod m.in. hodowli komórek *in vitro*, chemii analitycznej, mikroskopii konfokalnej, immunoenzymatycznych, genetycznych, molekularnych, a także statystycznych, co wskazuje na szeroki i doskonały warsztat badawczy Doktorantki. Podkreślić należy też udział mgr Śmiałek-Bartyzel w samodzielnym opracowaniu metodyki w przypadku niektórych z istotnych zadań badawczych takich jak np. określenia pomiaru wewnątrzkomórkowego pH, analizy uwalniania zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych przez ludzkie neutrofile w odpowiedzi na obecność bakteriocyny oraz oznaczenia wpływu antagonistów na inhibicję receptorów FPR i TLR, co dodatkowo świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Poza bezsporną wartością naukową trzech przedstawionych w rozprawie publikacji, podkreślić należy dobrze przygotowane omówienie pracy w postaci ogólnego wstępu teoretycznego, opisu wyników nieopublikowanych, dyskusji oraz przedstawionego w punktach obszernego podsumowania. To ilustrowane ośmioma rycinami 45-stronnicowe opracowanie, stanowi bardzo istotny element rozprawy wprowadzając w tematykę klasyfikacji, budowy i działania bakteriocyn,

charakterystyki procesu bursztynylacji, roli receptorów biorących udział w procesach odpowiedzi zapalnej (wstęp), a następnie, podsumowując przedstawione prace, prezentuje je na tle dotychczasowo poznanej wiedzy (dyskusja). W części poświęconej danym nieopublikowanym Doktorantka prezentuje badania, które dały w większości wyniki negatywne, jednak ta część unaocznia dodatkowy wkład pracy, jaki został włożony w realizację pracy doktorskiej i wskazuje alternatywne podejścia, które zostały wykonane w celu weryfikacji postawionych hipotez badawczych. Pomimo tego, iż w rozprawie nie zaprezentowano opisu poszczególnych publikacji, to wspólne opracowanie przystępnie je opisuje, co wskazuje na umiejętność ich omówienia i podkreśla zbieżny nurt badań. W tych częściach znalazłam jednak kilka błędów formalnych i merytorycznych, które mogą wynikać z niedostatecznej korekty tekstu. Wśród nich mogę wymienić błędne przypisanie w streszczeniu polskim jak i angielskim błonie biologicznej ładunku dodatniego, podczas gdy błony bakteryjne są oczywiście naładowane ujemnie ze względu na obecność wysoce elektroujemnych grup na ich składowych fosfolipidach i lipopolisacharydach. Stąd zresztą w większości wynika działanie przeciwdrobnoustrojowe bakteriocyn, które zwykle mają dodatni ładunek, tak jak to jest np. w przypadku BacSp222. W opisie wyników nieopublikowanych Doktorantka używa też nieprawidłowego terminu „oporność na bakteriocynę” lub „białko opornościowe” w przypadku warunkowania tego procesu przez białko kodowane w operonie biosyntezy bakteriocyny. W takim przypadku ten proces jest warunkowany przez tzw. białko odpornościowe (ang. „immunity protein”) i mówimy o procesie „odporności” (ang. „immunity”), a nie „oporności” (ang. „resistance”), który dotyczy mechanizmu nabytego przez np. mutację genetyczną. Dodatkowo, w tekście brakuje odnośników do wielu rysunków, nazwy genów nie są pisane kursywą, niektóre skróty i wyrazy są zapisane w sposób niezgodny z normami ortograficznymi (np. kropki po skrócie wyrazu „minuta”, „...nie podlegają modyfikacją potranslacyjnym...”, „...50-ciu lub 51-en...”), lub w formie żargonu laboratoryjnego (np. peptydy kodowane na plazmidach, na chromosomie), co bynajmniej nie podważa naukowej wartości rozprawy, ale czasami stoi w opozycji do tego skądinąd dobrze dopracowanego tekstu, a obowiązkiem recenzenta jest takie niedociągnięcia wskazać.

W związku z tematyką pracy i prezentowanymi wynikami miałabym kilka zagadnień do przedyskutowania podczas obrony:

- bakteriocyny ze względu na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową, odpowiednie parametry fizykochemiczne oraz często niską toksyczność dla komórek eukariotycznych mają spory potencjał do zastosowania w medycynie, który jednak nigdy nie został w pełni wykorzystany. Jaka może być tego przyczyna, że np. antybiotyki peptydowe znalazły zastosowanie w leczeniu zakażeń bakteriami patogennymi, a fenomenalna w odniesieniu do jej aktywności przeciwbakteryjnej nizyna stosowana jest tylko jako konserwant żywności? Czy wg opinii Doktorantki przyczyną mogą być jakieś różnice pomiędzy tymi dwoma grupami związków (antybiotyki peptydowe versus bakteriocyny), a jeśli tak, to konkretnie jakie?

- we wstępie rozprawy znajduje się informacja, że ze względu na rozwijające się zjawisko oporności bakterii na stosowane antybiotyki, stafylokokcyny mogłyby znaleźć zastosowanie w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych. Skąd wiadomo, że użycie bakteriocyn nie będzie prowadzić do rozwoju analogicznych jak w przypadku antybiotyków mechanizmów oporności? Chciałabym się dowiedzieć, jaki jest aktualny stan wiedzy na temat badań molekularnych odnośnie mechanizmów rozwoju oporności na bakteriocyny, oraz czy mogą występować oporności krzyżowe z antybiotykami?

- chciałam się dowiedzieć czy wg opinii Doktorantki bursztynylacja lizyn w bakteriocynach może być procesem powszechnym (wg otrzymanych wyników inne badane *in vitro* bakteriocyny również ulegały tej modyfikacji), czy dotyczy tylko raczej specyficznych bakteriocyn? Jakie to może mieć skutki w odniesieniu do zmian w obecnej klasyfikacji bakteriocyn, wg której bakteriocyny modyfikowane potranslacyjnie stanowią odrębną grupę od tych niemodyfikowanych. Czy możemy oczekiwać jakiegoś przewrotu w obecnym podziale na skutek przeniesienia wielu bakteriocyn z jednej grupy do drugiej?

Podsumowując chciałam podkreślić, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska wnosi bardzo dużo nowych informacji odnośnie identyfikacji nieznanej dotąd wśród bakteriocyn modyfikacji potranslacyjnej oraz niedostatecznie dotąd eksplorowanej charakterystyki molekularnych mechanizmów działania bakteriocyn na komórki eukariotyczne.

W konkluzji uznaję, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel w pełni spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Justyny Śmiałek-Bartyzel do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Zwracam się również do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego z prośbą o rozważenie przyznania stosownego wyróżnienia z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy.

Warszawa; 21/09/2023



Tamara Aleksandrak-Piekarczyk